第 39 卷 第 2 期 昆 虫 学 报 Vol.39, No.2
1996 年 5 月 ACTA ENTOMOLOGICA SINICA May, 1996

昆虫神经肽 allatostatin 与 allatotropin 的研究新近展*

关 雪 辰
(中国科学院动物研究所 北京 100080)

昆虫神经激素是肽类激素，它控制昆虫许多关键的生理过程，例如生长、变态、生殖和行为等。保幼激素(JH)对昆虫的卵子发生成熟起着重要的调控作用。它是由咽侧体(corpora allata, CA)合成并释放到血淋巴。 脑神经细胞分泌的神经肽通过神经或体液传递到 CA，以调控 CA 的 JH 合成，从而控制成虫的卵子发育、成熟。

近年来，人们对控制 JH 合成的机理研究很感兴趣。昆虫神经肽激素，咽侧体静止激素(Allatostatin, AS) 和咽侧体活化激素(Allatotropin, AT) 的研究进展迅速。国外的研究者利用 RP－HPLC, FAB－MS 等色谱新技术证明脑神经分泌细胞可分泌调控 JH 生物合成的神经肽类激素即 AS 和 AT[1]。它们是由十多个氨基酸构成的小肽，可以促进或抑制咽侧体对 JH 的合成。在国内对这一族系的神经肽也开始了研究。已发现七星瓢虫*Coccinella septempunctata*脑分泌一种可活化 CA 的活化因子(Allatotropic factor)[7]，以及粘虫*Mythimna separata*成虫 CA 分泌的 JH 对生殖的抑制作用是受脑神经分泌细胞分泌的 CA 静止因子(Allatostatic factor)[8] 的控制。本文介绍 AS 和 AT 研究中的一些最新进展。

1 AS 和 AT 的初级结构分析

昆虫脑细胞分泌的神经肽类激素具有调节其内分泌腺及其它激素的功能；它可包括几类激素，如调控前胸腺活性的促前胸腺激素(prothoracicotropin, PTTH)和调节 JH合成的 AS 和 AT。近二、三十年中 PTTH 的研究进展较快，已测定了家蚕素的一级结构。然而对 AS、AT 的研究只是近年来由于放射化学，色谱分析及基因工程技术的应用才加速其发展。首先 Kramer 实验室从烟草天蛾*Manduca sexta*成虫头部分离、纯化出 AT，它是由 13 个氨基酸构成的小肽，可强烈地促进体外 CA 的 JH 合成[7]。不久他们又以同种昆虫鉴定出 AS[9]。AS 研究较多的是太平洋折翅蠊*Diploptera punctata*。早在 1980 年 Tobe 对影响 JH 合成的调节因子进行了研究，结果表明 AS 产生于脑神经分泌细胞，通过神经(或体液)传递到 CA，抑制 CA 活性[10]。 只在近几年，有几个实验室才先后从折翅蠊脑，CC－CA 中分离出 7 种 AS[5,11]。它们是由 8 ～ 18 个氨基酸构成。其氨基酸序列有一定的相似性，C－末端的氨基酸已酰胺化(－phe－gly－leu－$CONH_2$)，

* 国家自然科学基金资助项目
1995－04－03 收稿，1995－08－31 收修改稿

表明这些肽类属同一族系。脑神经肽 AS 和 AT 的初级结构分析有助于从分子水平了解 JH 生物合成的调节。

2 AS的结构与活性的关系

在 AS 初级结构鉴定的基础上 Hayes 等对 AS 族系中最小的一个肽 AS－4 的结构与活性进行了研究[12]。

使用单个的丙氨酸和 D－氨基酸依次取代 AS－4 肽链上各位氨基酸，合成两个 AS－4 类似物系列，以确定 AS－4 的每个侧链在抑制 JH 合成中的重要性。了解 AS－4 类似物与肽的受体间的相互作用，确定与受体相结合的肽结构区。这些研究表明 AS－4 侧链对抑制 JH 合成是重要的。AS－4 氨基酸残基用丙氨酸替代可导致一个有效侧链的丧失，因而降低了抑制 JH 合成的效应。靠近肽链 C 末端的肽区含有与受体相互作用的核心氨基酸残基。用 D－氨基酸替代将会破坏生物活性，因受体需要在这些肽的结构区进行结合与活化。这些资料表明 AS－4 结构与活性是密切相关的。AS－4 氨基酸侧链携带抑制 JH 合成的信息。CA 细胞受体可与神经肽互相识别与结合。

3 AS 的分布、传递与生理功能

由折翅蠊和烟草天蛾脑鉴定出两种调控 JH 合成的 AS 和 AT 表明脑是 AS、AT 来源的一个重要器官。Stay 等用免疫细胞化学方法证明 AS 可广泛分布于折翅蠊的神经系统，如脑、CC－CA 复合体、触角搏动器官神经[37]。Yu 等也应用酶联免疫法 ELISA 测定了交配折翅蠊雌虫脑、CA、血淋巴及中、后肠中的 AS 含量变化。观测到脑中 AS 量的变化和雌虫生殖周期变化密切相关，而在未交配的雌虫没有这种变化，表明 AS 在此生殖期对 JH 合成起重要调节作用。卵黄发生期(羽化后 4 d雌虫) AS－I的含量最低，此时 JH 合成最高。体外生测 CA 和血淋巴中 AS 量的变化同样表明卵黄发生期和怀卵期雌虫 CA 中的 AS 含量少，卵黄发生后立即增加。在交配雌虫血中 AS－I 免疫反应物质的量也随生殖周期而变化，卵黄发生期低，产卵时出现高峰(最大为 2.25 nm)，以后下降。此外，使用 AS－I 单抗免疫化学反应，在触角神经中显示很强的免疫活性。经 Sep-pak 纯化的提取物连续进行两次 Hplc 可分离出 5 个具有 AS 活性峰。这些研究进一步说明了 AS 可广泛地分布于神经系统和一些组织中。

免疫化学研究证明 AS 是通过侧神经分泌细胞传递到 CA[10,13,14]。而且 AS 也循环于血淋巴中。电生理研究资料表明，如电刺激连接 CA 的轴突束，CA 细胞产生超极化，说明在体外 CA 可释放 AS[15]。血淋巴中 AS 免疫反应物质的存在说明这些物质也可通过体液途径传递到 CA 产生抑制作用。在生活周期的不同发育期，CA 的 JH 合成可受两种传递途径调节。

昆虫神经肽结构鉴定迅速发展，不仅由脑及 CA 中分离出 7 种 AS，而且在其它的内部器官，如在中、后肠都可明显地测出 AS 免疫反应物质，表明 AS 可能有调节肌肉活动的功能。许多已鉴定结构的昆虫神经肽有这种作用，但它们的 AS 序列不同[16]。AS

存在于脑中间的神经原表明可起神经调节剂作用，即AS可能有感觉调节剂作用。

AS的分布表明，AS除了调节JH合成，可能还有许多其它功能，所以神经肽可能是一种具有多功能的肽系。

4 影响AS释放的一些因子

许多因子如神经、JH类似物和卵巢等都可通过CA调控JH合成。连接脑与CA的神经，卵母细胞的发育和JH类似物的应用都可通过AS的释放影响CA活性。少量JH类似物局部施加虫体后可刺激JH合成，而高剂量则抑制JH合成，这已在折翅蠊和七星瓢虫中得到证明[17]。低剂量对JH合成产生刺激作用必须有卵巢存在，而高剂量不需要卵巢存在，但需要CA与脑之间的神经连接。这些实验表明无论是卵巢还是CA与脑之间的神经连接对JH合成的调节都是重要的。

卵巢和外源JH类似物对CA的作用与血淋巴中AS水平有关。在有完整神经连接的折翅蠊雄虫中，CA活性强烈地受到JH类似物7S－hydroprene的抑制，切除神经的CA则抑制作用小。经7S－hydroprene处理切除CA神经的昆虫血淋巴中AS含量明显增加(>3nmol/L，正常<0.04nmol/L)[14]。这些资料表明在CA神经末稍AS可以正常释放，由于CA的神经切除，AS释放到血淋巴中则较少地抑制CA的JH合成。当卵巢移植到7S－hydroprene处理的切断CA神经的雄虫则血淋巴中AS明显地减少。因此JH类似物对脑释放AS起作用，卵巢对抗这一作用。无论是JH类似物还是卵巢都是通过AS的释放影响JH合成。

5 神经肽的分子生物学研究

神经肽类激素具有作用的专一性。它们的类似物、拮抗物等都可以作为生长调节剂，进行基因工程研究。人们设想把肽类激素基因导入细菌或病毒、插入农作物以防治害虫。为此现已开始用分子生物学方法对神经肽进行研究。通过聚合酶连锁反应(PCR)用已知的基因去寻找并扩增编码其类似物的基因，是当前研究的热点。通过PCR扩增所得的目标基因可以用来作多种分析，如基因测序，神经肽的前体分析，基因表达的调控及转录和翻译后的加工及修饰等[18～20]。Feyereisen实验室应用分子生物学方法研究了AS的生理学。他们认为通过一个AS基因族系的存在和/或单一转译产物上存在多种肽可以解释在折翅蠊中AS肽系的多样性及AS广泛分布的原因。为此由折翅蠊雌虫脑克隆AS的前体cDNA。其结构表明AS前体编码cDNA编码[21]已知的几种AS和几个新肽。Tobe等应用聚合酶连锁反应由美洲蜚蠊*Periplaneta americana*获得了cDNA。它编码类似AS的肽[22]。另外Tayler等由烟草天蛾*Manduca sexta*蛹脑中分离出AT的基因，核苷酸序列分析表明AT是由一个多蛋白前体衍生而来[23]。

参　考　文　献

1 Woodhead A P, Khan M A, Stay B *et al*. Two new allatostatins from the brains of *Diploptera punctata*. Insect Biochem. Molec. Biol. M. 1994, 131

2 Masler E P. Insect neuropeptides: Discovery and application in insect management, Arch. Biochem. physiol. 1993, *22*: 87～111

3 Nagasawa H. Recent advances in insect neuropeptides. Comp. Biochem. Physiol. c. 1993, **106**c(2): 254～300

4 Kramer S J, Toschi A, Miller C A *et al*. Identification of an allatostatin from the tobacco hornworm *Manduca sexta*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991, **88**: 9458

5 Pratt G E, Farnsworth D E, Fok K F *et al*. Identity of a second type of allatostatin from cockroach brains: an octadecapeptide amide with a tyrosine-rich address sequence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991, **88**: 2412

6 Kataoka H, Toschi A, Li J P *et al*. Identification of an allatotropin from adult *Manduca sexta*. Science 1989, **243**, 1481

7 Guan Xuechen, Ouyang Yingchun, Wang Zongshun *in vitro* Activation of CA the allatotropic factors from the brains of *Coccinella septempuctata*. Chinese Science Bulletin. 1994, **39**(6): 509～513

8 Guan Xuechen, Ouyang Yingchun. Neurohormonal inhibitors of juvenile hormone biosynthesis in armyworm moths. Sinozoologia, 1994, **11**: 15～20

9 Kramer S J, Toschi A, Miller C A *et al*. Identification of an allatostatin from the tobacco hornworm *Manduca sexta*. Proc Natl. Acad. Sci. USA. 1991, **88**: 9458

10 Stay B, Chan K K, Woodhead A P. Allatostatin-immunoreactive neurons projecting to the corpora allata of adult *Diploptera punctata* Cell Tissue Res. 1992, **270**: 15～23

11 Woodhead Ap, Stay B, Seidel S L *et al*. Primary structure of four allatostatins: Neuropeptide inhibitors of juvenile hormone synthesis Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989, **86**: 5997

12 Hayes T K, Guan Xuechen, Johnson V *et al*. Structure-activity studies of allatostatin 4 on the inhibition of juvenile hormone biosynthesis by corpora allata: The importance of individual side chains and stereochemistry. Peptide. 1994, **15**(7): 1165～1171

13 Lange A B, Chan K K, Stay B. Effect of allatostatin and proctolin on antennal pulsate organ and hindgut muscle in the cockroach *Diploptera punctata*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 1993, **24**: 79～92

14 Stay B, Bachmann J A C, Staltzman C A *et al*. Factors affecting allatostatin release in a cockroach *Diploptera punctata*: nerve section, juvenile hormone analog and ovary. J. Insect. Physiol. 1994, **40**(5) 365～372

15 Thompson C S, Tobe S S. Innervation and electrophysiology of the corpus allatum. In Cockroaches as Models for neurobiology: Applications in biomedical Research (Eds HuberI, Masler EP and Rao BR) 1990, 89～101. CRC Press. Boca Raton. FL.

16 Holman G M, Nachman R J, Wright M S *et al*. Insect myotropic peptides: isolation, structural characterization, and biological activities. In Insect Neuropeptides. Menn J J, Kelly J J, Masler E P, eds. American chemical Society, Washington, DC. 1991, 40～50

17 Guan Xuechen. Effects on CA activity by an JH analogue in *Coccinella septempunctata*. Sinozzologia. 1987, **5**: 1～6

18 Kimura-kawakami M, Iwami M, Kawakami A *et al*. Structure and expression of bombyxin-related peptide genes of the moth *Samia cynthia ricini*. Gen. Comp. Endocr. 1992. **86**: 257 ~ 268

19 Lagueux M, Kromer E, Girardie J. Cloning of a Locuta cDNA encoding neuropesin A. Insect Biochem. Molec. Biol. 1992, **22**: 511 ~ 516

20 Kawano T, Kataoka H, Nagasawa H *et al*. cDNA cloning and sequence determination of the pheromone biosynthesis activating neuropeptide of the silkworm. *Bombyx mori*. Biochem. Biopsy. Res. Commun. 1992, **89**: 221 ~ 226

21 Reichwald K, Koener J f, Feyereisen R. Sequence of the allatostatin precursor gene from *Diploptara punctata* predicts new members of this peptide family. Second International. Symposium on Molecular Insect Science. Flagstaff, Arizona. USA. 1993, 135

22 Ding Q, Tobe S S, Bendena W G. Identification of allatostatin gene in *Periplaneta americana* and other specise. Flagstaff, Arizona. USA. 1993, 51

23 Taylor P A, Bhatt T, Horadyski F M. Isolation of the allatotropin gene from *Manduca sexta*. Second International Symposium on molecular Insect Science. Flagstaff, Arzona. USA. 1993, 166

RECENT ADVANCES IN RESEARCH ON INSECT NEUROPEPTIDES AS AND AT

Guan Xuechen

(*Institute of Zoology, Academia Sinica Beijing* 100080)

Abstract Recently, two families of insect neuropeptides, the allatostatin, and allatotropin, have been identified. All allatostatins and allatotropins identified so far are neurosecretory polypeptides. A 13-amino acid allatotropin has been identified from adult *Manduca sexta*. A group of five structurally related allatostatins has been identified from *Diploptara punctata*. They either inhibit (allatostatin) or stimulate (allatotropin) the production of JH by CA. In this paper recent advances in researchon insect neuropeptides AS and AT and their biological significance are reported.

Key words neuropeptides, juvenile hormone, corpora allata.